

Approved For Release STAT
2009/08/31 :
CIA-RDP88-00904R000100130

Dec 1988

Approved For Release
2009/08/31 :
CIA-RDP88-00904R000100130



Вторая Международная конференция
Организации Объединенных Наций
по применению атомной энергии
в мирных целях

A/CONF.15/P/13/S
USSR
ORIGINAL: RUSSIAN
25 YEAR RE-REVIEW

Не подлежит открытию до официального сообщения на Конференции

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФОСФОРНЫХ ЭФИРОВ ХОЛИНА, ЭТАНОЛАМИНА И
СЕРИНА В СИНТЕЗЕ ФОСФОЛИПИДОВ В ГОЛОВНОМ МОЗГУ

(Отдел биохимии Ин-та физиологии Академии наук
Грузинской ССР, Тбилиси)

П.А.Кометиани, Л.К.Ткешелашвили и Т.А.Овсянко

Фосфорные эфиры холина и этаноламина в животном организме встречаются как в свободном, так и связанном (в фосфолипидах) состояниях. Фосфорилсерин, находящийся с ними в близком биохимическом родстве, в свободном виде не найден. Он принимает участие в строении фосфолипидов и фосфопротеинов.

По нашим данным, в головном мозгу крыс содержится (в расчете на влажную ткань) в среднем около 3 мг% фосфорилхолина и 20 мг% фосфорилэтаноламина. В головном мозгу собак содержание этих эфиров больше. Наиболее богато ими серое вещество больших полушарий (1).

Обнаруженная одним из нас реакция фосфорилирования холина в препаратах головного мозга (2) подтверждается и данными других авторов (3). Нами выяснено, что холин фосфорилируется при сопряженной реакции окисления цитрата, ацетата и глутамата в присутствии адениловой системы. Важно отметить при этом, что фосфорилхолин используется в синтезе ацетилхолина. Этот факт также подтвержден недавно в исследовании Берри и Штотца (Berry a. Stots, 4).

Вопрос о непосредственном использовании фосфорных эфиров холина, этаноламина и серина в синтезе фосфолипидов, несмотря на ряд исследований, проведенных в этом направлении, все еще остается нерешенным. В особенности неизученным остается с этой стороны головной мозг - орган, который наиболее богат фосфолипидами. Исходя из того положения, что фосфор в фосфорилхолине и фосфорилэтаноламине обновляется быстрее фосфора фосфолипидов, а также имея в виду тот факт, что фосфорилхолин образуется в результате фосфорилирования холина, но не в результате распада

-2-

фосфолипидов, нужно думать, что эти соединения используются в синтезе фосфолипидов непосредственно. Против такого вывода, однако, говорят как старые исследования Чайкова (Chailoff, 5), Чаргера и Кестона (Chargaff a.Keston, 6), так и недавно полученные данные Корнберга и Прайцера (Kornberg a.Pricer, 7). Эти авторы склоняются к той мысли, что холин внедряется без предварительного фосфорилирования в диацилфосфатидиновую кислоту. Получены данные, которыми доказывается, что синтез фосфолипидов происходит путем эстерификации глицерофосфата жирной кислотой в присутствии аденоциантифосфата и коэнзима А.

Даусон (8) поставил перед собой задачу выяснить пути образования фосфорилхолина в печени: образуется ли он в результате гидролиза фосфатидилхолина или же непосредственным фосфорилированием холина. Анализ кривых скорости внедрения меченого фосфора в фосфорилхолин и фосфатидилхолин привел Даусона к заключению, что фосфорилхолин не используется в синтезе фосфатидилхолина.

С другой стороны, Корнберг и Прайцер (9) показали, что фосфорилхолин с двойной меткой по фосфору и по углероду в опытах с митохондриями печени внедряется в фосфатидилхолин без изменения соотношения активности углерода к активности фосфора. Кроме того, Родбел и Ханахан (Rodbell a.Hanahan, 10) выяснили, что фосфорилхолин включается в фосфатидиновую кислоту как целое с одновременным освобождением неорганического фосфата.

Противоречие, которое создалось в вопросе об использовании фосфорилхолина и фосфорилэтаноламина в синтезе фосфолипидов, находит объяснение в недавно открытом Кеннеди и Вейссом (Kennedy a. Weiss, 11) факте участия в синтезе фосфатидов цитидин-5-трифосфата. Как выясняется, фосфорилхолин в препаратах печени в присутствии цитидинтрифосфата непосредственно связывается с акцептором, образуя фосфатидилхолин. Кеннеди и Вейсс (11) предполагают, что в печени имеются два пути синтеза фосфатидилхолина. По первому пути холин принимает участие в синтезе в присут-

-13-

ствии аденоцинтрифосфата и коэнзима А. В качестве промежуточного продукта образуется пцил-коэнзим А и дипцилфосфатидиновая кислота. Холин связывается в последней стадии синтеза с диацилфосфатидиновой кислотой с образованием фосфатидилхолина (12). По второму пути фосфорилхолин непосредственно внедряется в диглицерид при помощи активирующего действия цитидинтрифосфата. Доказательством существования второго пути является тот факт, что продукт реакции холина с цитидинтрифосфатом цитидинфосфат-холин превращается в фосфатидилхолин быстрее, чем холин. Можно ли полученные выше данными авторами данные перенести на нервную ткань, остается невыясненным.

Перед нами была поставлена задача получить данные о путях синтеза фосфолипидов в головном мозгу, в частности разрешить вопрос непосредственного использования фосфорных эфиров холина, этаноламина и серина в синтезе фосфолипидов.

Методика исследования

Определение радиоактивности разных фракций фосфорных соединений производилось в установке Б бета-счетчиком согласно указаниям Смирнова (13).

Фракционирование фосфорных соединений производилось по Шмидту и Тангаузеру (Schmidt, a.Thanhauser, 14), по прописи Ивановой и Правдиной (15), а также Даусона (16,17).

Индивидуальные представители фосфолипидов выделялись в основном по прописи Даусона (16) и Норманна и Даусона (Normann a. Dauson, 18). С целью устранения ошибки, вызываемой загрязнением сопутствующих веществ, нам пришлось изменить методику. Фосфатидилэтаноламин и фосфатидилсерин нами определялись электрофоретическим выделением соответственно глицерилфосфорилэтаноламина и глицерилфосфорилсерина. Вышеназванные фосфолипиды подвергались фракционному гидролизу щелочью. Очищенный от балласта гидролизат доводился до малого объема и наносился в виде черты на бумагу шириной 4,5 см и длиной 38 см (из расчета 0,4 г мозга на одну бумагу). Электрофорез производился в ацетатно-пиридиновом буфере при pH=4,6 в продолжение 4 часов при напряжении 300 в и силе тока 1,5-2 ма. Местонахождение глицерилфосфорилэтаноламина и глицерилфосфорилсерина определялось нингидрином. Пятна на бумаге вырезались, экстрагировались водой и в экстракте

2463

- 1 -

с одной стороны, содержало P^{32} , а с другой, P^{31} . Стандартом служили приготовление нами из фосфолипидов головного мозга препараты глицирифосфорилэтаноламина и глицирифосфорилсерина. Индивидуальные фосфолипиды были выделены по Даусону (19). Гидролиз фосфолипидов с целью выделения двойных эфиров серина и этаноламина производился двуххористой ртутью.

Значения по фосфору фосфорилэтаноламина и фосфорилхолина были синтезированы по прописи Рилля (Riley, 20), а фосфорилсерина выделены нами методом Левина и Шорнеллера (Levine a. Schornelller, 21). Для синтеза фосфорилсерина мы брали 50 мкюри меченной по фосфору фосфорной кислоты и разбавляли ее 10 г тщательно обезвоженной ортоfosфорной кислотой. Смесь разогревали до выпадения белой мути, что указывало на переход части фосфорной кислоты в метаfosфорную кислоту. В эту еще теплую смесь добавляли 2 г серина (заранее высущенного над окисью фосфора) и тщательно размешивали до полного его растворения. После охлаждения в сосуд добавляли пентоксид фосфора в количестве 2 г. После этого сосуд плотно закрывали и оставляли при комнатной температуре 2 суток. В остальном мы следовали оригинальному методу (21).

Количественное определение фосфорных эфиров холина и этаноламина производилось методом распределительной хроматографии на бумаге. В качестве растворителя брали смесь бутилового спирта, уксусной кислоты и воды в отношении 5:1:4. Пятно фосфорилхолина проявлялось последовательной обработкой растворами сульфосалициловой кислоты и треххлористого железа, а пятно фосфорилэтаноламина никгидрином. В вышеупомянутом растворителе эти соединения не разделяются. Поэтому определение фосфора дает их суммарное содержание, определение холина — содержание фосфорилхолина, а определение свободной аминной группы никгидрином — содержание фосфорилэтаноламина (последние два определения служат проверкой первого).

Идентификация фосфорных эфиров холина и этаноламина производилась также совпадением локализации пятен и радиоактивности после хроматографирования на бумаге меченых соединений (22).

Суспензия головного мозга в виде 40% гомогената готовилась в приборе Поттера. Гомогенат разбавлялся равным объемом смеси, содержащей в конечной концентрации: вероналовый буфер $\text{pH}=7,2$, 0,4 М, фосфатный буфер $\text{pH}=7,2$, 0,001 М, одениловая кислота —

-5-

0,001М, хлористый магний 0,017 М, фтористый натрий - 0,019 М, глутамат - 0,02 М. Общий объем реакционной смеси был равен 10 мл. Смесь инкубировалась 2 часа в аэробных условиях.

Полученные данные и их обсуждение

Как известно, фосфолипиды не отличаются большой скоростью обновления (23,24). В связи с изучением этого вопроса было установлено, что в печени скорость обновления фосфора в фосфорилхолине и в фосфорилэтаноламине больше скорости обновления фосфолипидов. Это положение закономерно и для головного мозга (25).

Для того, чтобы иметь представление о различии в интенсивности обновления фосфорных эфиров холина и этаноламина в разных органах животного организма, мы поставили опыты на крысях. Под опытным животным вводился Р³² (50-100 мккори), а Р³¹ (5-10 мг на килограмм веса) в виде фосфата натрия. Спустя 3 часа после подкожного введения радиоактивного фосфора животные умертвлялись обезглавливанием, мозг быстро извлекался из черепной коробки и производился анализ. Ниже в табл. I приведены сравнительные данные относительной удельной активности фосфорилхолина и фосфорилэтаноламина в сердечной и скелетной мышцах, головном мозгу, печени, селезенке и почках.

Таблица I

Относительная удельная активность суммы фосфорных эфиров холина и этаноламина в разных органах крыс спустя 3 часа после подкожного введения радиоактивного фосфора

2453

Органы	Относительная удельная активность
Скелетные мышцы	31,0
Сердечная мышца	32
Головной мозг	110
Печень	73
Селезенка	46
Почки	35

-6-

Относительная удельная активность фосфорных эфиров здесь и ниже нами вычислялась из отношения:

$$\text{относительная уд.активность} = \frac{\text{уд.активность соединения} \times 100}{\text{уд.активность неорганического фосфата}}$$

Как видно из данных табл. I, скорость обновления интересующих нас соединений оказалась наибольшей в головном мозгу. Аналогичная картина была получена в опытах с кроликами и собаками.

В следующей серии опытов была поставлена задача выяснить скорость обновления фосфора в фосфорилхолине и фосфорилэтаноламине сравнительно с другими фосфорными соединениями головного мозга. Опыты были поставлены на собаках. Р³² вводился подкожно (в количестве 50-100 мкюри) совместно с Р³¹ (в количестве 5-10 мг на 1 кг живого веса). Анализ фосфорных соединений производился спустя 24 часа после введения.

Таблица 2

Относительная удельная активность фосфорных соединений головного мозга собак после подкожного введения меченого по фосфору неорганического фосфата. Анализ произведен спустя 24 часа после введения

Фракции фосфора				
Кислото-растворимая	Фосфатиди-холин и фос-фатидилэта-ноламин	Фосфоли-пидная	Рибонук-леиново-ая	Фосфопро-teinовая
57,7	23,5	9,6	9,8	110,9

Данные табл. 2 дают право заключить, что по скорости обновления в головном мозгу фосфорилхолин и фосфорилэтаноламин стоят впереди фосфолипидов и рибонуклеиновой кислоты, но уступают фосфопротеинам.

Если исходить из того положения, что скорость обновления фосфорных эфиров холина и этаноламина больше скорости обновления фосфолипидов, то нужно допустить, что эти соединения получаются не в результате распада фосфолипидов, а непосредственным фосфорированием холина и этаноламина.

-7-

Для выяснения возможности непосредственного использования фосфорных эфиров холина и этаноламина, а также серина в синтезе фосфолипидов стала необходимость поставить опыты с меченными соединениями. Опыты были поставлены на кроликах. Меченные соединения вводились субокципитально в количестве 2,5-3,0 мкюри на 1 кг живого веса. На это количество активного фосфора приходилось 1-1,5 мг Р³¹. Спустя 5 часов после введения производился анализ фосфорных соединений. Основные опыты с меченными фосфорными эфирами всегда сопровождались контрольными, где вместо эфира в аналогичных условиях животным вводился меченный неорганический фосфат.

Таблица 3

Удельная активность фосфорных соединений (число импульсов х $\times 10^{-3}$ /мг Р) после субокципитального введения кроликам меченого неорганического фосфата, меченых фосфорилхолина и фосфорилэтаноламина. Анализ произведен спустя 5 часов после введения

4/63

Фракции фосфора	Введение меченого	Неорганического фосфата	Фосфорилхолина	Фосфорилэтаноламина
Общая липидная		8,1	2,5	-
Фосфатидилхолина		9,8	8,8	-
Отношение: <u>фосфатидилхолин</u> общая липидная		1,1	3,5	-
Общая кефалиновая		25,6		10,5
Фосфатидилэтаноламин		9,3		8,8
Отношение: <u>фосфатидилэтаноламин</u> общая кефалиновая		0,36		0,84

В табл. 3 приведены результаты нескольких характерных опытов, полученных отдельно с введением меченого неорганического фосфата, меченого фосфорилхолина и меченого фосфорилэтаноламина.

В опыте с введением меченого неорганического фосфата отношение удельной активности фосфатидилхолина к удельной активности

-8-

общей липидной фракции равно 1,1, а в опыте с введением меченого фосфорилхолина это отношение равно 3,5. С другой стороны, в опыте с неорганическим фосфатом отношение удельной активности фосфатидилэтаноламина к общей кефалиновой фракции равно 0,36, а в опыте с введением меченого фосфорилэтаноламина это отношение равно 0,84. Более высокое отношение, которое устанавливается в опытах с фосфорилхолином и фосфорилэтаноламином, указывает на то обстоятельство, что эти соединения могут быть использованы непосредственно в синтезе соответственно фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина.

Вопрос использования фосфорилсерина в синтезе фосфатидилсерина и фосфопротеинов экспериментально до последнего времени не был изучен. Предпринятое нами в этом направлении исследование дало нам определенный ответ. Полученные данные позволяют утверждать, что фосфорилсерин как целое, без предварительного распада, используется в синтезе фосфатидилсерина, но не фосфопротеинов.

Техника постановки опытов была аналогична таковой в опытах с фосфорилхолином и фосфорилэтаноламином. Меченный фосфорилсерин вводился кроликам субокципитально в количестве 3 мкюри на животное.

Спустя 5 часов после введения меченых соединений под эфирным наркозом вскрывалась черепная полость и извлекался мозг. Определялась радиоактивность следующих фракций: общей фосфолипидной, общей кефалиновой, лецитиновой и отдельных представителей кефалиновой фракции-фосфатидилсерина и фосфатидилэтаноламина.

Предварительные опыты с субокципитальным введением меченого фосфорилсерина и меченого неорганического фосфата показали, что соотношение активности фосфора кефалиновой фракции к общей фосфолипидной в опытах с фосфорилсерином всегда было больше, чем в опытах с введением неорганического фосфата. С целью выяснения, за счет какого представителя кефалиновой фракции получилась высокая активность, в дальнейших опытах определялась активность отдельных представителей этой фракции, а именно фосфатидилсерина и фосфатидилэтаноламина.

Данные одного из вышеуказанных опытов приведены ниже в табл. 4.

-9-

Таблица 4

Удельная активность отдельных представителей фосфолипидов (число импульсов $\times 10^{-3}$ /мгР) после субокципитального введения кроликам меченого неорганического фосфата и меченого фосфорилсерина. Анализ произведен спустя 5 часов после введения

Фракции Введение меченого	Неорганического фосфата	Фосфорилсерина
Фосфолипиды	4,0	5,4
Кефалины	3,3	5,1
Фосфатидилхолин	5,0	3,4
Фосфатидилэтаноламин	5,5	1,3
Фосфатидилсерин	1,6	17,0
Отношение: <u>фосфатидилсерин</u> кефалины	0,5	10,6

Как видно из данных табл. 4, удельная активность фосфатидилсерина в опытах с введением меченого фосфорилсерина значительно превышает его активность в опытах с неорганическим фосфатом. В то время когда отношение удельной активности фосфатидилсерина к удельной активности кефалинов в опытах с введением меченого фосфорилсерина равно 10,6, в опытах с меченым неорганическим фосфатом оно равно лишь 0,5. Отсюда нужно сделать заключение, что фосфорилсерин непосредственно используется в синтезе фосфатидилсерина.

Опыты, где выяснялась возможность использования фосфорилсерина в синтезе фосфопротеинов, дали отрицательный ответ. Удельная активность фосфопротеиновой фракции в опытах с введением меченого фосфорилсерина показала величину, в 20 раз меньшую, чем в опытах с неорганическим фосфором.

Фосфорилхолин, фосфорилэтаноламин и фосфорилсерин представ-

4463

-10-

ляют полярные соединения с несимметричным распределением зарядов в своей молекуле. Такого рода соединения имеют большое влияние на физико-химическое состояние липопротеинов протоплазмы. Хокин и Хокин (Hokin a. Hokin, 26) обнаружили, что ацетилхолин в несколько раз усиливает внедрение меченого неорганического фосфата в фосфолипиды в суспензиях головного мозга. Имея в виду этот факт, мы поставили перед собой задачу выяснить, окажет ли аналогичный эффект фосфорилхолин. Опыты были поставлены с гомогенатом головного мозга. Холин, ацетилхолин и фосфорилхолин брали в конечной концентрации $0,5 \times 10^{-4}$ М. После двухчасового инкубирования с меченым неорганическим фосфатом активность 20 мкюри в аэробных условиях определялась активность разных фракций фосфорных соединений. Ниже приводятся результаты одного из подобных опытов.

Таблица 5

Влияние ацетилхолина, фосфорилхолина и холина на скорость внедрения меченого неорганического фосфора в фосфолипиды головного мозга (удельная активность - число импульсов $\times 10^{-3}/\text{мкР}$)

Фракции фосфора	Оощая липидная	Общая кефалиновая	Фосфатидилхолиновая
Реакционная среда +			
P ³²	16	12	1
P ³² + ацетилхолин	32	31	2
P ³² + фосфорилхолин	8	7	0,7
P ³² + холин	25	18	1,4

Из данных табл. 5 выясняется, что ацетилхолин, а также холин положительно влияют на скорость внедрения меченого неорганического фосфора в фосфолипиды. Это сказывается как в активности общей фосфолипидной, так и кефалиновой фракции и фракции лецитина. Фосфорилхолин, наоборот, оказал тормозящее влияние на внедрение меченого неорганического фосфата. Активность как лецитиновой, так и общей кефалиновой и общей липидной фракций в присутствии

-11-

фосфорилхолина оказалась значительно сниженной. Этот факт также указывает на предпочтительное использование в головном мозгу фосфорилхолина по сравнению с неорганическим фосфатом в синтезе фосфолипидов.

З а к л ю ч е н и е

Суммируя полученные нами данные при исследовании обмена фосфорных эфиров холина, этаноламина и серина в головном мозгу, мы приходим к следующему заключению:

- 1) фосфорилхолин образуется в головном мозгу первичным путем в результате фосфорилирования холина;
- 2) фосфорилхолин, фосфорилэтаноламин и фосфорилсерин могут быть использованы в синтезе соответственных фосфолипидов непосредственно без предварительного гидролиза;
- 3) фосфорилсерин в синтезе фосфопротеинов без предварительного гидролиза не используется;
- 4) фосфорилхолин в головном мозгу тормозит внедрение неорганического фосфата в фосфолипиды.

Л и т е р а т у р а

1. Ткешелашвили Я.К., Количество распределение фосфорилхолина и фосфорилэтаноламина в животном организме. Сообщ. Акад. наук Грузинской ССР, 1955, 17, 711
2. Кометиани П.А., Образование и превращения фосфорилхолина в процессе синтеза ацетилхолина в экстрактах головного мозга. Биохимия, 1952, 17, 108
3. Wittenberg J.a. Kornberg A., Choline phosphokinase, J.Biol. Chem., 1953, 202, 431
4. Berry J.a. Stotz E., Role of phosphorylcholine in acetylcholine synthesis, J.Biol.Chem., 1956, 218, 871
5. Chaikoff J., The application of labelling agents to the study of phospholipid metabolism, Physiol.Rev., 1942, 22, 291
6. Chargaff E. a. Keston A., The metabolism of aminoethyl-phosphoric acid followed by means of radioactive phosphorus isotope, J.Biol.Chem., 1944, 134, 515
7. Kornberg A. a. Pricer W., Enzymatic synthesis of the coenzyme A derivatives of long chain fatty acids, J.Biol.Chem., 1957, 204, 329

2453

8. Dawson R., Studies on the phosphorylcholine of rat liver, Biochem.J., 1956, 62, 693
9. Kornberg A. a. Pricer W., Studies on the enzymatic synthesis of phospholipides, Feder.Proc., 1952, 11, 242
10. Rodbell M. a. Hanahn D., Lecithin synthesis in liver, J.Biol.Chem., 1955, 214, 607
11. Kennedy E. a. Weiss S., Cytidine diphosphate choline a new intermediate in lecithin biosynthesis, J.Amer.Chem. Soc., 1955, 77, 230
12. Kennedy E., Synthesis of phosphatides in isolated mitochondria I., J.Biol.Chem., 1953, 201, 399 а также Incorporation of choline into lecithin, J.Biol.Chem., 1954, 209, 525
13. Смирнов А.А., О методике измерения активности изотопа фосфора P^{32} , Биохимия, 1953, 18, 223
14. Schmidt G.a. Thanhauser S., A method for determination of desoxyribonucleic acid, ribonucleic acid, and phosphoproteins in animal tissues, J.Biol.Chem., 1945, 161, 83
15. Иванова Т.Н. и Правдина Н.И., К вопросу о методах определения скорости обновления нуклеиновых кислот в ткани мозга, Докл., 1954, 95, 845
16. Dawson R., The incorporation of labelled phosphate into the lipids of a brain dispersion, Biochem.J., 1953, 55, 507
17. Dawson R., The measurement of P^{32} labelling of individual cephalins and lecithin in a small sample of tissue, Bioch.Biophys.Acta, 1954, 14, 374
18. Normann J.a. Dawson R., A method for measuring the deposition of P^{32} in phosphatidylethanolamine and its application to the rat-brain tissue, Bioch.J., 1953, 54, 396
19. Dawson R., Studies on the labelling of brain phospholipides with radioactive phosphorus, Biochem.J., 1954, 57, 237
20. Riley R., Metabolism of phosphorylcholine: I Synthesis of calcium phosphorylcholine chloride containing the radioactive isotope P^{32} , J.Amer.Chem.Soc., 1944, 66, 512
21. Levene P. a. Schormüller S., Synthesis of the phosphoric esters of hydroxyamino acids II The synthesis of dl-serine-phosphoric acid, J.Biol.Chem., 1934, 105, 547

-13-

22. Ткешелашвили Л.К., Количественное распределение и скорость обновления фосфорилхолина и фосфорилэтаноламина в живом организме. Труды Ин-та физиологии Академии наук Грузинской ССР, 1956, 10, 317

23. Владимицов Г.Е., Функциональная биохимия мозга, Физиол. ж., 1953, 39, 3

24. Крепс Е.М., Фосфолипиды в нервной ткани, Усп.совр.биол., 1956, 41, 261

25. Кометиани П.А., Исследование распределения и превращений фосфорилхолина, этаноламинфосфата и глутаминовой кислоты в головном мозгу. Сб.Биохимия нервной системы, Киев, 1954, стр. 98

26. Hokin M. a. Hokin L., Effects of acetylcholine of phosphat turnover in phospholipides on brain cortex in vitro, Biochem.Biophys.Acta, 1955, 16, 229

2463